

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.





PCT

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 21/08, G01N 33/577 // C12N 5/20, 15/06 (C12P 21/08 C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/13096  (43) 国際公開日 1992年8月6日(06.08.1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00041 (22) 国際出願日 1992年1月21日(21.01.92)  (30) 優先権データ 特願字 3/78155 1991年1月21日(21.01.91) JP  (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 富士薬品工業株式会社 (FUJI YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 Toyama, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 岡田保典(OKADA, Yasunori)[JP/JP] 〒924 石川県松任市若宮2丁目32番地 Ishikawa, (JP) 新名正由(SHINMEI, Masayoshi)[JP/JP] 〒359 埼玉県所沢市中新井4丁目4番4号 Saitama, (JP) 早川太郎(HAYAKAWA, Taro)[JP/JP] 〒468 愛知県名古屋市中区向が丘3丁目406番地 Aichi, (JP) 岩田和士(IWATA, Kazushi)[JP/JP] 〒933 富山県高岡市五十里東町190番地 Toyama, (JP) 香林優美(KORIN, Yumi)[JP/JP] 〒929-12 石川県河北郡高松町フ-134 Ishikawa, (JP) 小玉修範(KODAMA, Shuji)[JP/JP] 〒933 富山県高岡市長江1868 高岡スカイハイッ603号 Toyama, (JP)	吉田真一(YOSHIDA, Shinichi)[JP/JP] 〒930 富山県富山市中島4丁目13番16号 Toyama, (JP) (74) 代理人 弁理士 南 孝夫(MINAMI, Takao) 〒102 東京都千代田区豊町3丁目2番地 相互第一ビル Tokyo, (JP)  (81) 指定国 DE(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), IT(欧州特許), US.  添付公開書類 国際調査報告書 補正書	
(54) Title: ANTIHUMAN STROMELYSIN MONOCLONAL ANTIBODY AND DIAGNOSIS OF RHEUMATOID ARTHRITIS BY ENZYME IMMUNOASSAY		
(54) 発明の名称 抗ヒトストロムライシンモノクローナル抗体及び酵素免疫測定法による慢性関節リウマチ疾患の診断法		
(57) Abstract  The invention provides as an antibody against human stromelysin a monoclonal antibody which has an immunoreactivity with only one of the antigenic determinants present in human stromelysin and reacts with either of cryptic and active stromelysins indiscriminately. The concurrent use of two kinds of monoclonal antibodies, each of which specifically combines with one of the two different antigenic determinants of human stromelysin, allows human stromelysin present in the bodily fluid to be accurately determined, thus enabling diagnosis of rheumatoid arthritis. The invention provides a method of enzyme immunoassay of human stromelysin present in the bodily fluid by the sandwich technique using the above monoclonal antibody itself and two kinds thereof, and a method of diagnosing rheumatoid arthritis thereby.		

(57) 要約

ヒトストロムライシンの抗体として、ヒトストロムライシンに存在する抗原決定基のうち、いずれか一つの抗原決定基のみに免疫反応性を有し、潜在型ストロムライシンと活性型ストロムライシンとを区別することなく反応するモノクローナル抗体を提供し、ヒトストロムライシンの異なる2つの抗原決定基に対し、それぞれ特異的に結合するモノクローナル抗体2種の組合せ使用により、ヒトの体液中のヒトストロムライシンを正確に定量することを可能にし、慢性関節リウマチ疾患の診断を可能にする。

上記のモノクローナル抗体それ自体ならびにその2種を使用して、サンドイッチ法により、酵素免疫測定法により、検体としてのヒトの体液中に存在するヒトストロムライシンを定量することを特徴とする方法およびその方法により慢性関節リウマチ疾患を診断する方法を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	MG	マダガスカル
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	ML	マリ
BB	バルバドス	FR	フランス	MN	モンゴル
BE	ベルギー	GA	ガボン	MR	モーリタニア
BF	ブルキナファソ	GN	ギニア	MW	マラウイ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NL	オランダ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	NO	ノルウェー
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	PL	ポーランド
CA	カナダ	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CG	コンゴ	JP	日本	SD	スーダン
CH	スイス	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CI	コートジボワール	KR	大韓民国	SN	セネガル
CM	カメルーン	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CS	南スロバキア	LK	スリランカ	TD	チャド
DE	ドイツ	LU	ルクセンブルク	UG	ウガンダ
DK	デンマーク	MC	モナコ	US	米国

## 明 細 書

抗ヒトストロムライシンモノクローナル抗体  
及び酵素免疫測定法による慢性関節リウマチ  
疾患の診断法

5

## 〔技術分野〕

本発明は、抗ヒトストロムライシンモノクローナル抗体、及びそのモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法ならびに該測定法に基づき、検体中に存在するヒトストロムライシンを潜在型ストロムライシンの量及び活性型ストロムライシンの量の総和として定量し、それによ

10 って、慢性関節リウマチ疾患を診断する方法に関する。

## 〔背景技術〕

ストロムライシンは、プロテオグリカナーゼあるいは

15 MMP-3（マトリックスメタロプロティナーゼ-3）とも呼ばれ、各種のサイトカインあるいは各種の増殖因子などで刺激された線維芽細胞や腫瘍細胞で産生される物質である。生体内では、慢性関節リウマチ疾患患者の関節局所で産生されるほか、血液中あるいは関節液中に存

20 在する。

ストロムライシンは、関節軟骨の重要な細胞外マトリックスであるプロテオグリカン及びIX型コラーゲンのほか、ゼラチン、ラミニン、IV型コラーゲンやフィブロネクチンなどを分解することから、慢性関節リウマチ疾患

25 患者の関節内部の軟骨破壊に重要な役割を果たすものと

考えられている。

ストロムライシンは潜在型ストロムライシン（プロストロムライシンともいう）として産生され、細胞外で活性化されて活性型ストロムライシンへと変換される。潜在型ストロムライシンをプラスミンやトリプシンなどのセリンプロテアーゼで処理すると、ストロムライシンは限定分解され、活性型のストロムライシンとなる。

また、潜在型のストロムライシンを4-アミノフェニル酢酸第二水銀（APMA）で処理した場合にも活性型ストロムライシンが生成する。潜在型ストロムライシンの分子量は57,000ダルトン（57kD）あるいは59,000（59kD）であり、59kDのストロムライシンは57kDのストロムライシンに糖鎖が結合したものである。

また、プロテアーゼ消化して得られた活性型ストロムライシンの分子量は45kDであるが、APMA処理した場合には、得られた活性型ストロムライシンの分子量は45kDと46kDであるが、APMAによる処理時間を12時間以上にと、さらに低分子化した28kDの分子量の活性型ストロムライシンが得られる。

従来、慢性関節リウマチ疾患の診断には、リウマチ因子の検出法に基づいたRose法、Rose法のHellerによる変法、RAHA-テスト及びRA-テストなどが用いられている。しかし、これらの方法では血中におけるリウマチ因子の存在は慢性関節リウマチ疾患に特異的ではないこと、これまでのリウマチ因子の測定キットは定量性や再現性に

乏しいなどの欠点を有する。

また、赤血球沈降速度（赤沈値）やC反応性蛋白質（CRP）の測定は、上記疾患の活動性を知ることはできるが、診断には適さないこと、抗核抗体やLE細胞の検出については、疾患特異性が低く、他の膠原病疾患でも良く検出されることなどにより、正確に慢性関節リウマチ疾患を診断することは困難である。また、ヒアルロン酸を定量する方法も存在するが、その部分は、検体として関節液のみが用いられるという点で不便である。

10 ヒストロムライシンは、種々の関節疾患のうちでも特に慢性関節リウマチ疾患において、その疾患患者の関節局所で多量に合成・分泌されていることが見出された。変形性関節症疾患患者の滑膜表層細胞や関節軟骨細胞もストロムライシンを合成・分泌しているが、慢性関節リウマチ疾患では、多発性の関節炎を生じるのに対し、変形性関節症疾患では、通常、単発性であることから、変形性関節症疾患患者の血中あるいは関節液中のストロムライシン量には健常人の場合に比べて著明な増加は認められない。

20 現在までのところ、上記のような関節破壊の指標となる生化学的マーカーは全く見出されていないため、本発明は慢性関節リウマチの診断に関して、特に有意義である。

〔発明の開示〕

25 本発明は、ハイブリドーマによるIgGクラスの抗ヒト

ストロムライシンモノクローナル抗体ならびにその製造方法、及び上記モノクローナル抗体を用いるサンドイッチ法に基づくヒトストロムライシンの酵素免疫測定法及びその測定法により慢性関節リウマチ疾患患者の血液その他の検体中のストロムライシン量を定量し、その定量値を健常人の相当する検体中のストロムライシンの定量値と比較することに基づき慢性関節リウマチ疾患を診断する方法を提供するものである。

すなわち、本発明は、

10 (1) ヒトストロムライシンに存在する抗原決定基のうち、いずれか一つの抗原決定基のみに免疫反応性を有する各モノクローナル抗体であって、潜在型ストロムライシン(プロストロムライシン)と活性型ストロムライシンとを区別することなく反応するモノクローナル抗体、

15 (2) ヒトストロムライシンの異なる2つの抗原決定基に対し、それぞれ特異的に結合するモノクローナル抗体2種の組み合わせを用いてサンドイッチ法により、潜在型ストロムライシンの量と活性型ストロムライシンの量の総和を定量することを特徴とするヒトストロムライシンの酵素免疫測定法、

20 (3) 上記の酵素免疫測定法により、検体中に存在するヒトストロムライシンを潜在型ストロムライシンの量と活性型ストロムライシンの量の総和として定量し、その定量値を健常人の相当する検体の定量値と比較すること  
25 に基づき、慢性関節リウマチ疾患を診断する方法



を提供するものである。

本発明において用いられる上記の酵素免疫測定法は、後掲の実施例により説明されるところから理解されようが、たとえば、酵素免疫測定法としては、第一抗体固相  
5 法、二抗体法、エミット法(Enzyme multiplied immuno-assay technique: EMIT)、エンザイムチャンネリングイムノアッセイ法、酵素活性修飾物質イムノアッセイ法及びリポソーム膜-酵素イムノアッセイ法などの競合法や、あるいは、サンドイッチ法、イムノエンザイムメトリック  
10 アッセイ法、酵素活性増強イムノアッセイ法及びブロキシマールリンケージイムノアッセイ法などの非競合法の通常の各種酵素免疫学的測定方法の中から任意に選択し、これを行うことができる。

上記の測定法においては、固相担体としては、抗原や  
15 抗体を受動的に良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製、あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、試験管などの種々の材料を使用することができ、また、その形態も任意に適切なものを選択し、使用することができる。

20 用いられる標識用酵素の例としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼあるいは $\beta$ -D-ガラクトシダーゼなどがあげられ、また、それらの酵素活性を測定する手段としては、比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法などを選択し、随時これらの酵素及び  
25 酵素活性測定法を採択して、適宜組み合わせ使用す

ことにより測定を行うことができる。

一方、酵素標識を付与する抗体としては、抗体含有物を硫酸分画した後、DEAE-セファセルの如き陰イオン交換ゲルにより精製したIgG画分、さらには、ペプシン消化後、還元して得られる特異的結合部分Fab'を用いることもできる。

以下、実施例により、本発明によるモノクローナル抗体ならびにその製造方法及び該モノクローナル抗体を使用してヒトストロムライシンを酵素免疫学的に測定する方法、さらには、その測定方法を用いて慢性関節リウマチ疾患を診断する方法について具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 〔実施例1〕

抗ヒトストロムライシンモノクローナル抗体の作製

##### 15 (a) 抗原-ヒトプロストロムライシンの調製

Biochem. J. 254, 731~741(1988)に記載の本発明者らによる方法に従い、慢性関節リウマチ疾患患者の滑膜細胞をダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬製)で培養した。すなわち、関節形成術を行った慢性関節リウマチ患者の滑膜組織を細切し、酵素学的に滑膜細胞を遊離させた後、20%ウシ胎児血清、ペニシリン及びストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地中で培養した。

上記文献記載に準拠して初代培養して得られた細胞を、  
25 次に、ウサギ・マクロファージで処理した無血清培地で

さらに培養し、5～7日目にその培養液を回収した。得られた培養液をDEAE-セルロースカラム(Whatman製)、グリーンAダイマトレックスカラム(Amicon Corp. 製)、ゼラチンセファロースカラム、コンカナバリンAセファロースカラム(Pharmacia製)及び抗コラゲナーゼ抗体結合アフィニティカラムで処理した後、最後にウルトロゲルAcA44カラム(LKB製)を用いてヒトストロムライシンを精製した。

得られた精製ヒトストロムライシンをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供したところ、分子量約57kDの単一バンドを示した。この精製ヒトストロムライシンは潜在型のプロストロムライシンである。また、このものは上記処理においてコンカナバリンAセファロースカラムを用いて得られたものであるため、糖鎖が結合している59kDのプロストロムライシンを含んでいない。

#### (b) 抗体産生細胞の調製

6週令のBalb/c雌マウス2匹にまずフロインド完全アジュバンドを用いて、前記(a)項で記述した精製ヒトプロストロムライシンで初回免疫した。すなわち、それぞれのマウスに15 $\mu$ gのヒトプロストロムライシンを0.2mlの溶液として腹腔内投与した。その後、17日目に10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に溶解した15 $\mu$ gのヒトプロストロムライシンを追加免疫した。最終免疫として54日目に静脈内投与〔16.5 $\mu$ g/マウス; 10mMトリス-塩酸緩

衝液(pH7.5)に溶解)により補助免疫し、3日後にマウス脾臓を取り出し、脾臓細胞を調製した。

(c) 細胞融合

(1) 以下の材料及び方法を用いる。

5        RPMI 1640培地 : RPMI No.1640 (Flow Lab.製) に重炭酸ナトリウム(24mM)、ピルビン酸ナトリウム(1 mM)、ペニシリンGカリウム(50 U / mL)、硫酸ストレプトマイシン(50 µg / mL) 及び硫酸アミカシン(100 µg / mL) を加え、  
10        ドライアイスでpHを7.2にし、0.2 µm東洋メンブレンフィルターで除菌濾過する。

NS-1培地 : 上記RPMI 1640培地に除菌濾過した仔牛胎児血清(W.A. Bioproducts製) を15% (v/v)の濃度になるように加える。

15        PEG 4,000溶液 : RPMI 1640培地のポリエチレングリコール4,000 (PEG 4,000、Merck & Co. 製) 50% (w/w) 無血清溶液を調製する。

8 - アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP-2 (SP-2 / O-Ag14) との融合は、Selected Method in Cellular Immunology(ed. B.B. Mishell & S.M. Shiigi)、W.H.  
20        Freeman & Company (1980) 、351~372に記載のOiらの方法に準拠して行った。

(2) 前記(b)項で調製した有核脾臓細胞 (生細胞率100%) とミエローマ細胞(生細胞率100%) とを5 : 1の割合で融合する。すなわち脾臓細胞とミエローマ細胞とを  
25        別々に前記RPMI 1640培地で洗浄する。次に同じ培地に

懸濁し、融合させるため上記の割合で混合する。容量50  
μlの円錐形スチロール樹脂製試験管（住友ベークライト  
製）を用い、37μlのRPMI 1640培地中1,000rpm、10分間  
遠心分離し、上清を完全に吸出する。沈殿した細胞に37  
5 °Cで加温したPEG 4,000溶液4.5μlを穏やかに攪拌しなが  
ら1分間滴下し、さらに1分間攪拌し、細胞を再懸濁、  
分散させる。次に37°Cで加温したRPMI 1640培地4.5μl  
を1分間で滴下する。

この操作をさらに1回繰り返した後、同培地31.7μlを  
10 2〜3分間で常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させ  
る。これを1,000rpm、7分間遠心分離し、上清を完全に  
吸引除去する。次に沈殿した細胞に、37°Cで加温したNS  
-1培地45μlをすみやかに加え、細胞の大きい塊を10μl  
のピペットで注意深く分散させる。

15. これを、同培地91μlの入ったボトルに加えて希釈し、  
ポリスチレン製96穴マイクロウェル（岩城硝子製）にウ  
ェル当たり $6.0 \times 10^5$ 個/0.1μlの細胞を加える。このマ  
イクロウェルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37°C、  
湿度100%下で培養する。

20 (d) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

(1) 使用する培地は以下のとおりである。

HAT培地：前記(c)項で述べたNS-1培地に、さらにヒ  
ポキサンチン（100μM）、アミノプテリン（0.4μM）及び  
チミジン（16μM）を加える。

25 HT培地：アミノプテリンを除去した以外は上記HAT培

地と同一組成の培地である。

(2) 前記(c)項の培養開始後翌日(1日目)、細胞にピ  
ペットでHAT培地2滴(約0.1ml)を加える。2、3、5  
及び8日目にそれぞれ培地の半分(0.1ml)を新しいHAT  
5 培地で置き換え、10日目に培地の半分を新しいHT培地で  
置き換える。このとき、ハイブリドーマの十分な生育が  
観察される。ハイブリドーマが生育した全ウェルについ  
て、次項(e)記載の固相-抗体結合テスト法(ELISA)に  
より陽性ウェルを確認する。

10 次にフィーダーとして $10^7$ 個のマウス胸腺細胞を含む  
HT培地1mlをポリスチレン製24穴セルウェル(住友ベ  
ークライト製)に加えたものを用い、上記で検出された各  
陽性ハイブリドーマの全内容物を移す。これを前記(c)  
におけると同様に7%炭酸ガス存在下、37℃で5日間培  
15 養する。ハイブリドーマの充分生育した時点でELISAに  
より陽性を再確認し、それぞれについて次項(f)記載の  
限界希釈法によるクローニングを行う。なお、クローニ  
ングに使用した後の残液をポリスチレン製25cm<sup>2</sup>組織培  
養フラスコ(岩城硝子製)に移し、凍結保存用試料とす  
20 る。

(e) 固相-抗体結合テスト(ELISA)による抗ヒトストロ  
ムライシン抗体産生ハイブリドーマの検索

Anal. Biochem. 104, 205~214(1980)に記載のRennard  
らの方法に準拠して行う。この方法は、ハイブリドーマ  
25 抗体の検出に適している。96穴マイクロタイトレーション

プレート(Flow Lab. 製) を  $30\text{ ng}$  / ウェルのヒトストロム  
ライシンでコートする。これに前記(d)で得られたハイ  
ブリドーマ生育ウェルの上清の一部を加えて室温で約 1  
時間インキュベートする。2 次抗体として POD 標識ヤギ  
5 抗マウスイムノグロブリン(Cappel Lab. 製) を加え、さ  
らに室温で約 1 時間インキュベートする。次に基質であ  
る過酸化水素と  $\text{o}$ -フェニレンジアミンを加え、マイク  
ロプレートリーダー (MRP-A4、東洋ソーダ製) を用いて  
 $492\text{ nm}$  の吸光度を測定する。

10 (f) クローニング

前記(d)の操作後、各ウェル中には 2 種以上のハイブ  
リドーマが生育している可能性があるので、限界希釈法  
によりクローニングを行い、モノクローナル抗体産生ハ  
イブリドーマを取得する。NS-1 培地  $1\text{ mL}$  当たりフィー  
15 ダーとして  $10^7$  個のマウス胸腺細胞を含むクローニング  
培地を調製し、96 穴マイクロウェルの 36 ウェル、36 ウェ  
ル及び 24 ウェルにウェル当たりそれぞれ 5 個、1 個及び  
0.5 個のハイブリドーマを加える。

5 日目に全ウェルに約  $0.1\text{ mL}$  の NS-1 培地を追加し、10  
20 日目に培地の半分 ( $0.1\text{ mL}$ ) を新しい NS-1 培地で置き換  
える。クローニング開始後 14 日目でハイブリドーマの充  
分な生育が認められ、それらについて ELISA を行った。  
テストした全ウェルが陽性でない場合、抗体陽性ウェル  
中のコロニー数を確認し、ウェル中に 1 コロニーが確認  
25 されたウェルを 1 個選び再クローニングする。最終的に

ヒトストロムライシンに対するモノクローナル抗体産生  
ハイブリドーマ14株が得られた。

(g) ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の大量産  
生

- 5      ハイブリドーマの増殖は常法によって行う。すなわち、  
得られた各ハイブリドーマをNS-1培地などの適当な培  
養液で培養し、その培養上清から10~100 $\mu$ g/ $\mu$ lの濃度  
のモノクローナル抗体を得ることができる。一方、大量  
に抗体を得るためには、脾臓細胞とミエローマ細胞の由  
10      来動物と同系の動物 (Balb/c マウス) にマウス1匹当  
たり0.5 $\mu$ lの腫瘍形成促進剤プリスタン (2,6,10,14-テ  
トラメチルペンタデカン、Aldrich Chem. 製) を腹腔内  
投与する。

- 15      1~3週間後に、各ハイブリドーマ  $1 \times 10^7$  個を同じ  
く腹腔内投与し、さらにその1~2週間後に4~7 $\mu$ g/  
 $\mu$ lのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができ  
る。

(h) モノクローナル抗体のアイソタイプ

- 20      前述したELISA法に従って、ヒトストロムライシンを  
コートしたマイクロタイトレーションプレートに、各モノ  
クローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えた。  
0.05% ツイン20含有PBSで洗浄した後、アイソタイプ特  
異的ウサギ抗マウスIg抗体 (Zymed Lab. 製) を加えた。  
PBSによる洗浄後、POD標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L) 抗体  
25      を加え、基質として過酸化水素及び2,2'-アジノージ



(3-エチルベンゾチアゾリン硫酸)を用いて検出した。

その結果をまとめて後掲の表1に示す。得られたヒトストロムライシンに対するモノクローナル抗体のうち、10個が免疫グロブリン鎖 $\gamma 1/\kappa$ を、2個が $\gamma 2a/\kappa$ を、  
5 又、2個が $\gamma 2b/\kappa$ を有していた。又、ヒトストロムライシンとの反応性については、後掲の(j)項に記載した方法により得られた結果である。

(i) モノクローナル抗体の精製

前記(g)項で得られた各腹水をアフィゲルプロテイン  
10 A MAPS-IIキット(Bio-Rad製)を用いて精製した。

(j) ヒトストロムライシンとモノクローナル抗体との反応性

Biochem. J. 254, 731~741(1988)に本発明者らが記載しているように、ヒト滑膜細胞の培養液中には、分子  
15 量59kDと57kDの潜在型のストロムライシンが存在する。  
しかし、この培養液を $Ca^{2+}$ の存在下で4-アミノフェニル酢酸第二水銀(APMA)で処理すると、潜在型ストロムライシンは活性化し、分子量46kDと45kDの活性型ストロムライシンが得られる。そこで、潜在型ストロムライシン  
20 を含む上記培養液及び活性型ストロムライシンを含むAPMA処理した培養液をSDS-PAGEに供した。

次に、POD標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン(Cappel Lab.製)を用いて、細胞工学1&2、1061~1068(1983)に記載の田部の方法に従ってウェスタンブロッティング  
25 を行い、実施例1(i)項で得られた各モノクローナル抗

体と潜在型ストロムライシン（59kD及び57kD）との反応性、及び各モノクローナル抗体と活性型ストロムライシン（46kD及び45kD）との反応性を検討した。

この結果を表1に示す。表1に示すとおり、14種類のモノクローナル抗体はいずれも潜在型ストロムライシン及び活性型ストロムライシンの全てと反応することが認められた。一方、培養液中には、潜在型コラゲナーゼや潜在型ゼラチナーゼも共存するが、上記のウェスタンブロットティングパターンでは、ストロムライシンの分子量に相当する60kD及び57kDのバンドが認められただけで、コラゲナーゼの分子量に相当する55kD及び52kD、また、ゼラチナーゼの分子量に相当する72kDのバンドは検出されなかった。従って、上記の14種類のモノクローナル抗体は、コラゲナーゼやゼラチナーゼとは反応せず、ストロムライシンと特異的に反応することが認められた。

#### 〔実施例2〕

抗ヒトストロムライシンモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色

ヒトストロムライシンは、細胞内で産生された後、細胞内に貯蔵されることなく、細胞外に持続的に分泌される。そこで、どのような細胞でヒトストロムライシンが産生されているのかを知る目的で、ヒトストロムライシンを産生する細胞内に蓄積させるために、モネンシン（2 $\mu$ M）の存在下で慢性関節リウマチ疾患患者の滑膜組織を3時間培養した。

上記組織を、ペリオデイトーリジン-パラホルムアル  
デヒド固定し、パラフィン切片を作製した。脱パラフィ  
ンしたこれらの切片中の内因性ペルオキシダーゼを過酸  
化水素でブロックした後、実施例1の(i)項で得られた  
5 抗ヒストロムライシンモノクローナル抗体(IgG)と反  
応させた。つぎに、その切片をPBSで充分洗浄し、ビオ  
チン化ウマ抗マウスIgG(H+L)と反応させた後、さらに  
アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼコンプレックス  
(Vector Lab.製)と反応させた。

10 上記のようにして得られた切片をPBSで洗浄した後、  
基質としてジアミノベンチジン及び過酸化水素を用いて  
発色させた。抗ヒストロムライシンモノクローナル抗  
体としてIgG(クローン55-2A4)及びIgG(クローン55-  
3G3)を用いたときの免疫組織染色では、いずれも、ヒ  
15 トストロムライシンは、慢性関節リウマチ疾患患者の滑  
膜表層細胞に陽性に染色された。従って、クローン55-  
2A4及びクローン55-3G3は、いずれも、免疫組織染色に  
使用できることが判明した。

上記のクローン番号55-2A4のハイブリドーマは、微  
20 工研菌寄第12303号(FERM P-12303)の受託番号をもっ  
て、微生物工業技術研究所に寄託されており、また、同  
クローン番号55-3G3のハイブリドーマは、微工研菌寄  
第12304号(FERM P-12304)の受託番号をもって、同研  
究所に寄託されている。

25 [実施例3]

## ヒストロムライシンの定量法

## (a) 酵素標識モノクローナル抗体の調製

## (1) Fab'画分の調製

実施例 1 (i) 項で得られた各精製モノクローナル抗体  
5 (IgG) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、その溶液  
を以下述べるようにしてペプシンで消化した。すなわち、  
上記 IgG に対して 2 % (w/w) のペプシンを加え、37℃、  
24時間消化した。

さらにその消化物に、2 M トリス溶液を加えて pH を  
10 7.0 に調整することによって反応を停止させ、0.1M リン  
酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化したウルトロゲル AcA44 カラ  
ムを用いたゲル濾過により、F(ab')<sub>2</sub> 画分を分取した。

次に、この F(ab')<sub>2</sub> 画分を 5 mM エチレンジアミン四酢  
酸 (EDTA) 含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.0) 中で透析し、  
15 最終濃度 10mM となるようにアミノエタンチオールを加え  
37℃ で 90 分間還元した後、5 mM EDTA 含有 0.1M リン酸緩  
衝液 (pH6.0) で平衡化したウルトロゲル AcA44 カラムを  
用いてゲル濾過し、Fab' 画分を分取した。

## (2) マレイミド標識 POD 画分の調製

20 上記 (1) 項の操作とは別に、以下に述べるようにして  
POD にマレイミドを標識した。すなわち、POD を 10 mg / ml  
の量で 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、その POD に  
対して、25 倍モル量の N - (ε - マレイミドカプロイル  
オキシ)コハク酸イミドをジメチルホルムアミド (DMF) 溶  
25 液として加え、30℃、30 分間反応させた。これを 0.1M

リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したセファデックス G-50 カラムでゲル濾過し、マレイミド標識 POD 画分を分取した。

### (3) Fab' - POD 複合体画分の調製

- 5 前記(1)項で調製した画分中の Fab' に対して、上記(2)項で得られた画分中のマレイミド標識 POD として等モルになるように両画分を混合し、さらに Fab' 及びマレイミド標識 POD の最終濃度が 100  $\mu$ M となるように、5 mM EDTA 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.0) で希釈した。
- 10 この混合液を 4  $^{\circ}$ C、20 時間反応後、Fab' の 10 倍モル量の N-エチルマレイミドで未反応のチオール基をブロックした。これを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.5) で平衡化したウルトロゲル AcA44 カラムを用いてゲル濾過し、Fab' - POD 複合体画分を分取後、0.1% ウシ血清アルブミン
- 15 (BSA) 及び 0.001% クロルヘキシジンを添加し、4  $^{\circ}$ C で保存した。

### (b) モノクローナル抗体結合ボールの調製

- J. Immunoassay 4, 209~327 (1983) に記載の Ishikawa らの方法に従って、実施例 1(i) 項で得られた
- 20 精製モノクローナル抗体を 0.1% アジ化ナトリウム含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、その濃度を 100  $\mu$ g /  $\mu$ l に調整した。

- このモノクローナル抗体溶液にポリスチレンボール (径 6.5  $\mu$ m、Precision Plastic Ball 製) を浸漬し、4  $^{\circ}$ C
- 25 に 24 時間静置した。次にモノクローナル抗体溶液を除去

した後、0.1% BSA、0.1% 塩化ナトリウム及び0.001% クロルヘキシジン含有10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄し、4℃にて保存した。

(c) 酵素免疫測定法

5 実施例1(a)項で得られた精製ヒトプロストロムライシンを、0.1M塩化ナトリウム及び1% BSA含有10mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて、1280ng/μlの溶液を調製し、これを段階希釈した溶液を各々50μlずつとり、標準試料とした。

10 一方、検体試料としては、健常人血清、慢性関節リウマチ疾患(RA)患者血清及び変形性関節症疾患(OA)患者血清を各々50μl用いた。

上記の試料をそれぞれ試験管にとり、上記(a)で調製したFab'-POD複合体画分(100ng/μl)、0.1M塩化ナトリウム及び10mM EDTA含有30mMリン酸緩衝液(pH7.0) 300  
15 μlに溶解した。次にこれらの各々の試験管に、前記にて調製したモノクローナル抗体結合ポリスチレンボールを1個ずつ添加して、室温で1時間静置した後、50mM塩化ナトリウム含有5mMリン酸緩衝液(pH7.0)にて洗浄し  
20 た。

次に、9% DMF含有0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に溶解したPOD基質、すなわち、0.025%テトラメチルベンチジンを300μlずつ加え、さらに0.0075%過酸化水素水を300μl  
25 ずつ加え、室温で30分間静置した後、1.7 N硫酸1400μlを添加することにより反応を停止させた。島津マイクロ

フロー紫外可視分光光度計(UV-730)を用いて、反応混合液の波長450nmの吸光度を測定し、標準試料から作成した検量線により、検体試料の吸光度に相当するヒストロムライシン濃度を読み取った。

- 5 IgG(クローン55-3G3)を固相用抗体とし、IgG(クローン55-2A4)を標識用抗体として用いて得られた標準曲線を図1に示す。ただし、上記以外のモノクローナル抗体の組み合わせでもヒストロムライシンの定量は可能であるが、上記の組み合わせで得られた感度が最も高かった。また、表1に示したように、得られたモノクローナル抗体は、潜在型ストロムライシン及び活性型ストロムライシンの両方と反応性を有している。従って、上記のサンドイッチアッセイ系でも検体中の潜在型ストロムライシン及び活性型ストロムライシンの両方ともに定量
- 10 している。

- 15 一方、実施例1の(j)項に記載したように、固相用抗体及び標識用抗体はいずれもコラゲナーゼやゼラチナーゼと反応しないので、上記のアッセイ系においてはストロムライシンのみを特異的に定量している。図1に示されているように、ヒストロムライシン標準試料の濃度の上昇に伴って、 $A_{450}$ は増加しており、定量感度は、試料1  $\mu$ l当たり20ng/ $\mu$ lであった。
- 20

(d) RA患者及びOA患者についてのストロムライシンの定量

- 25 上記(c)項において示した酵素免疫測定法により、健

常人、RA患者及びOA患者の血中ストロムライシンを定量した。すなわち、検体試料として健常人血清（9検体）、RA患者血清（10検体）及びOA患者血清（11検体）を各々50 $\mu$ lずつ用いて、ストロムライシン濃度を測定した。その結果、表2にみられるように、健常人血清中のストロムライシン濃度（平均値 $\pm$ S.D.）は、65.9 $\pm$ 20.3ng/ $\mu$ lであった。

一方、RA患者血清中のストロムライシン濃度（平均 $\pm$ S.D.）は731.8 $\pm$ 369.4ng/ $\mu$ lであり、この値は健常人血清中のストロムライシン濃度に比し有意に高いことが認められた。一方、OA患者血清中のストロムライシン濃度は84.3 $\pm$ 49.6ng/ $\mu$ lであり、健常人血清中のストロムライシン濃度と有意な差は認められなかった。

なお、上記の診断にあたっての検体としては、血液あるいは関節炎のほか、適宜、生体から得られるストロムライシン含有試料を用いることができる。

次に、RA患者及びOA患者の関節液中ストロムライシンを定量した。すなわち、検体試料としてRA患者関節液（9検体）及びOA患者関節液（10検体）について、ストロムライシン濃度を測定した。ただし、関節液50 $\mu$ lを用いた場合、測定値（A<sub>450</sub>）は検量線の範囲を越えるため、予め10～100倍に希釈した関節液を試料とした。

その結果、表3にみられるように、RA患者関節液中のストロムライシン濃度（平均 $\pm$ S.D.）は49257 $\pm$ 23267ng/ $\mu$ lであり、この値はOA患者関節液中のストロムライシ



ン濃度 ( $10097 \pm 640 \text{ ng} / \mu\text{l}$ ) に比し有意に高かった。

5

10

15

20

25

表 1

	クローン番号	サブクラス	ストロムライシンとの反応性	
			潜在型	活性型
5	55-1F5	IgG1 / $\kappa$	+	+
	55-2A4	IgG1 / $\kappa$	+	+
	55-3G3	IgG1 / $\kappa$	+	+
	55-6F10	IgG2a / $\kappa$	+	+
	55-7C10	IgG2b / $\kappa$	+	+
10	55-8A3	IgG2a / $\kappa$	+	+
	55-9A9	IgG1 / $\kappa$	+	+
	55-10H2	IgG1 / $\kappa$	+	+
	55-11F1	IgG2b / $\kappa$	+	+
	55-14G6	IgG1 / $\kappa$	+	+
15	55-16D5	IgG1 / $\kappa$	+	+
	55-18D2	IgG1 / $\kappa$	+	+
	55-19D5	IgG1 / $\kappa$	+	+
	55-20A2	IgG1 / $\kappa$	+	+

20

25

表 2

健常人血清		RA患者血清		OA患者血清	
検体 番号	ストロムライシン 濃度 (ng/μl)	検体 番号	ストロムライシン 濃度 (ng/μl)	検体 番号	ストロムライシン 濃度 (ng/μl)
1	42	1	470	1	170
2	66	2	650	2	81
3	53	3	1500	3	20
4	66	4	790	4	34
5	42	5	118	5	75
6	64	6	500	6	113
7	68	7	570	7	156
8	87	8	960	8	70
9	105	9	940	9	98
		10	820	10	20
				11	90
平均	65.9	平均	731.8	平均	84.3
S. D.	20.3	S. D.	369.4	S. D.	49.6

表 3

R A患者関節液		O A患者関節液	
検体 番号	ストロムライシン 濃度 (ng/μl)	検体 番号	ストロムライシン 濃度 (ng/μl)
1	22050	1	2478
2	58800	2	19320
3	69300	3	6405
4	79800	4	5040
5	4200	5	10080
6	56280	6	21000
7	46200	7	13440
8	57960	8	11760
9	48724	9	8505
		10	2940
平均	49257	平均	10097
S. D.	23267	S. D.	6402

〔図面の簡単な説明〕

図 1 は、実施例 3 の(c)項で得られた標準曲線、すなわち、IgG(クローン55-3G3)を固相用抗体とし、IgG(クローン55-2A4)を標識用抗体として用いた1段階サンドイッチ法における、ヒトストロムライシンの標準曲線を示す図である。

## 請 求 の 範 囲

1. ヒトストロムライシンに存在する抗原決定基のうち、  
いずれか一つの抗原決定基のみに免疫反応性を有する  
各モノクローナル抗体であって、潜在型ストロムライ  
5 シン（プロストロムライシン）と活性型ストロムライ  
シンとを区別することなく反応するモノクローナル抗  
体。
2. ヒトストロムライシンの異なる2つの抗原決定基に  
対し、それぞれ特異的に結合する請求項1記載のモノ  
10 クローナル抗体2種の組み合わせを用いてサンドイッ  
チ法により、潜在型ストロムライシンの量と活性型ス  
トロムライシンの量の総和を定量することを特徴とす  
るヒトストロムライシンの酵素免疫測定法。
3. 請求項2に記載の酵素免疫測定法により、検体中に  
15 存在するヒトストロムライシンを潜在型ストロムライ  
シンの量と活性型ストロムライシンの量の総和として  
定量し、その定量値を健常人の相当する検体の定量値  
と比較することに基づき、慢性関節リウマチ疾患を診  
断する方法。
- 20 4. 上記の検体がヒト滑膜組織である請求項3に記載の  
慢性関節リウマチ疾患を診断する方法。

[1992年6月18日(18.06.92)国際事務局受理;出願当初の請求の範囲4は補正された;新しい請求の範囲5が加わった;他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. ヒトストロムライシンに存在する抗原決定基のうち、  
いずれか一つの抗原決定基のみに免疫反応性を有する  
各モノクローナル抗体であって、潜在型ストロムライ  
5 シン（プロストロムライシン）と活性型ストロムライ  
シンとを区別することなく反応するモノクローナル抗  
体。
2. ヒトストロムライシンの異なる2つの抗原決定基に  
対し、それぞれ特異的に結合する請求項1記載のモノ  
10 クローナル抗体2種の組み合わせを用いてサンドイッ  
チ法により、潜在型ストロムライシンの量と活性型ス  
トロムライシンの量の総和を定量することを特徴とす  
るヒトストロムライシンの酵素免疫測定法。
3. 請求項2に記載の酵素免疫測定法により、検体中に  
15 存在するヒトストロムライシンを潜在型ストロムライ  
シンの量と活性型ストロムライシンの量の総和として  
定量し、その定量値を健常人の相当する検体の定量値  
と比較することに基づき、慢性関節リウマチ疾患を診  
断する方法。
- 20 4. （補正後）上記の検体がヒト血液あるいはヒト関節  
液である請求項3に記載の慢性関節リウマチ疾患を診  
断する方法。
5. （追加）ヒト滑膜組織を検体とし、請求項1に記載  
のモノクローナル抗体を用いて、検体中のストロムラ  
25 イシンを免疫組織化学的に検出することにより慢性関

節リウマチ疾患を診断する方法。

5

10

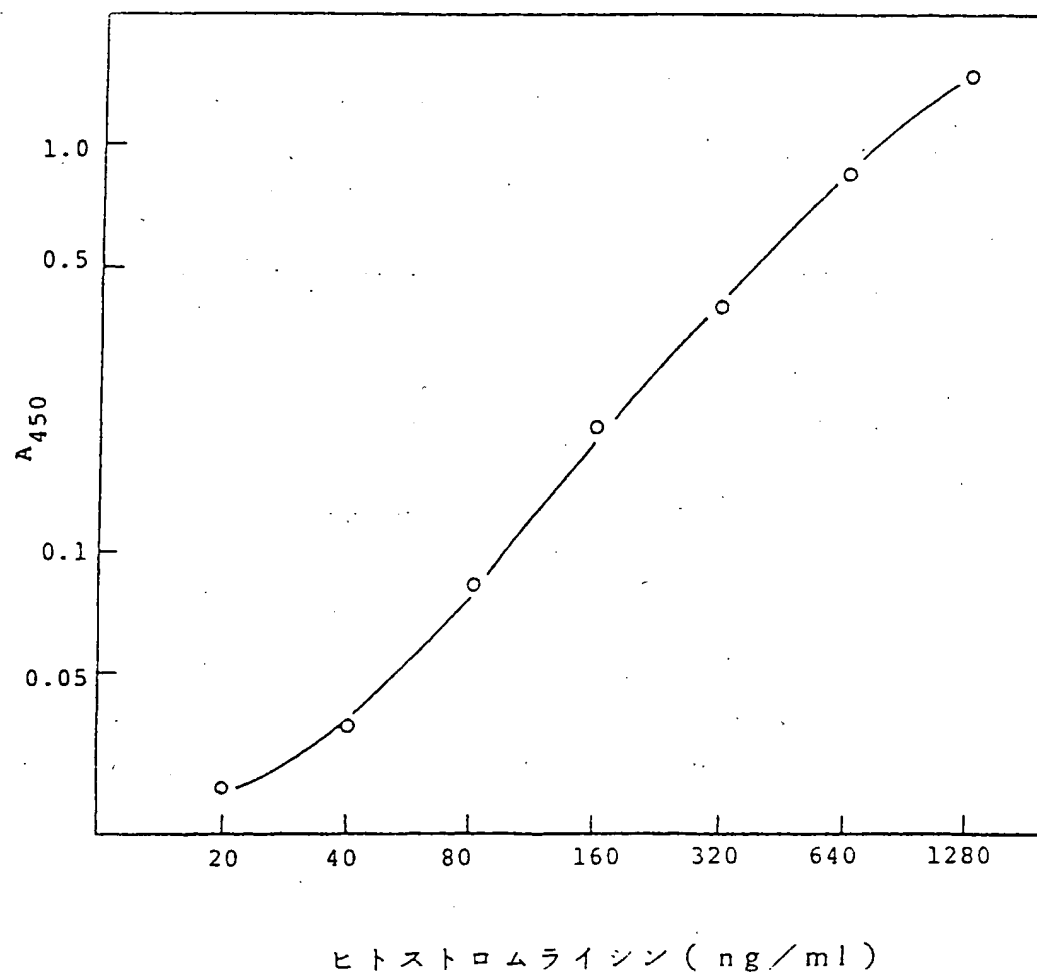
15

20

25

1 / 1

図 1





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00041

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> C12P21/08, G01N33/577//C12N5/20, 15/06, (C12P21/08, C12R1:91)		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System :	Classification Symbols	
IPC	C12P21/08, G01N33/577, C12N5/16-5/28, 15/06-15/08	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *</b>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 28, (1990), K. L. MacNaul et al. "Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts" p. 17238-17245	1-4
Y	American Journal of Pathology, Vol. 135, No. 6, (1989), J. P. Case et al. "Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium. A transformation- associated metalloproteinase secreted by phenotypically invisable synoviocytes" p. 1055-1064	1-4
Y	Nature, Vol. 256, (1975), G. Köhler et al. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" p. 495-497	1-4
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
April 6, 1992 (06. 04. 92)	April 28, 1992 (28. 04. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Office:	
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 92/ 00041

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC)		
Int. Cl <sup>1</sup> C12P21/08, G01N33/577 // C12N5/20, 15/06, (C12P21/08, C12R1:91)		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	C12P21/08, G01N33/577, C12N5/16-5/28, 15/06-15/08	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X	Journal of Biological Chemistry, 第265 巻, 第28号, (1990), K. L. MacNaul et al. "Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rheumatoid human synovial fibrobla- sts " p. 17238-17245	1-4
Y	American Journal of Pathology, 第135巻, 第6号, (1989), J. P. Case et al. "Tran- sin/stromelysin expression in rheumatoid synovium. A transformation-associated metalloproteinase secreted by phenotypic- ally invasible synoviocytes " p. 1055- 1064	1-4
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に基及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の 日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解 のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新 規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進 歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 証 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
06.04.92	28.04.92	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 2 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	内 田 俊 生

第2ページから続く情報

( Ⅲ欄の続き )

Y Nature, 第256巻, (1975), G. Köhler 1-4  
et al. "Continuous cultures of fused  
cells secreting antibody of predefined  
specificity" p. 495-497

V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
3. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
4. 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**